

**Metode uji residu antibakterial secara *enzyme linked immuno assay* (ELISA) pada daging ikan dan udang  
– Bagian 2: *Sulfonamide***





© BSN 2013

Hak cipta dilindungi undang-undang. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh isi dokumen ini dengan cara dan dalam bentuk apapun serta dilarang mendistribusikan dokumen ini baik secara elektronik maupun tercetak tanpa izin tertulis dari BSN

BSN  
Gd. Manggala Wanabakti  
Blok IV, Lt. 3,4,7,10.  
Telp. +6221-5747043  
Fax. +6221-5747045  
Email: [dokinfo@bsn.go.id](mailto:dokinfo@bsn.go.id)  
[www.bsn.go.id](http://www.bsn.go.id)

Diterbitkan di Jakarta



## Daftar isi

Daftar isi.....	i
Prakata .....	ii
1 Ruang lingkup.....	1
2 Istilah dan definisi .....	1
3 Prinsip.....	2
4 Peralatan .....	2
5 Bahan .....	2
6 Prosedur kerja .....	3
7 Perhitungan hasil.....	4
8 Intepretasi hasil .....	4
9 Pengendalian mutu hasil uji.....	4
Lampiran A (informatif) Bagan alir ekstraksi contoh uji untuk analisis <i>sulfonamide</i> .....	5
Lampiran B (informatif) Bagan alir <i>assay</i> prosedur ELISA untuk analisis <i>sulfonamide</i> .....	6
Bibliografi .....	8
Gambar A.1 - Bagan alir ekstraksi contoh uji untuk analisis <i>sulfonamide</i> .....	5
Gambar B.1 - Bagan alir <i>assay</i> prosedur ELISA untuk analisis <i>sulfonamide</i> .....	6
Gambar C.1 - Kurva kalibrasi standar <i>sulfonamide</i> .....	7
Tabel C.1 – Susunan standar <i>sulfonamide</i> dan contoh uji pada <i>well</i> .....	7



## Prakata

Dalam rangka keberlanjutan usaha budidaya, meningkatkan produktivitas, dan memberikan jaminan mutu komoditas perikanan serta memberikan hasil uji yang akurat bagi setiap pengujian di laboratorium acuan dan uji, maka perlu disusun suatu Standar Nasional Indonesia (SNI) tentang metode uji residu antibakterial secara *enzyme linked immunoassay* (ELISA) pada daging ikan dan udang – Bagian 2 : *Sulfonamide*.

Standar ini dirumuskan oleh Subpanitia Teknis (SPT) 65-05-S2 Perikanan Budidaya dan telah dibahas melalui rapat teknis serta terakhir disepakati dalam rapat konsensus pada tanggal 9 November 2011 di Riau, yang dihadiri oleh unsur pemerintah, produsen, konsumen, lembaga penelitian, perguruan tinggi, serta instansi terkait sebagai upaya untuk meningkatkan jaminan mutu dan keakuratan hasil uji dengan memperhatikan:

1. Peraturan Menteri Kelautan dan Perikanan RI. No.Per.19/Men/2010 tentang Pengendalian sistem jaminan mutu dan keamanan hasil perikanan.
2. Peraturan Menteri Kelautan dan Perikanan RI. No.Per.02/Men/2007 tentang Monitoring residu obat, bahan kimia, bahan biologis dan pencemaran pada pembudidayaan ikan.
3. Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI. No.Kep.01/Men/2002 tentang Sistem Manajemen Mutu Terpadu Hasil Perikanan.
4. Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI. No.Kep.06/Men/2002 tentang Persyaratan dan Tata Cara Pemeriksaan Mutu Hasil Perikanan yang Masuk ke Wilayah Republik Indonesia.
5. Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI. No.Kep. 26/2002 tentang Penyediaan, Peredaran, Penggunaan dan Pengawasan Obat Ikan;
6. Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI. No.Kep.20/2003 tentang Klasifikasi Obat Ikan;
7. Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI. No.Kep.21/Men/2004 tentang Sistem Pengawasan dan Pengendalian Mutu Hasil Perikanan untuk Pasar Uni Eropa.
8. Keputusan Menteri Kelautan dan Perikanan RI. No. Kep 01/Men/2007 tentang Persyaratan Jaminan Mutu dan Keamanan Hasil Perikanan pada Proses Produksi, Pengolahan dan Distribusi.
9. Keputusan Direktur Jenderal Perikanan Budidaya No. No. 06/DPB/HK.150/S4/VII/2007 tentang Pedoman Pelaksanaan Monitoring Residu Obat, Bahan Kimia, Bahan Biologi.dan atau kontaminan pada Pembudidayaan Ikan.
10. Keputusan Direktur Jenderal Perikanan Budidaya No. 106/DJPB/2011 tentang Batas Maksimum Residu pada Komoditi Ikan.

Standar ini telah melalui proses jajak pendapat pada tanggal 9 April 2012 sampai 8 Juni 2012 dengan hasil akhir RASNI.



## Metode uji residu antibakterial secara *enzyme linked immunoassay* (ELISA) pada daging ikan dan udang – Bagian 2 : *Sulfonamide*

### 1 Ruang lingkup

Standar ini menetapkan pengujian residu antibakterial sulfonamide pada daging ikan dan udang dengan metode *enzyme linked immunoassay* (ELISA). Metode ini mampu menguji pada rentang 0,1 ng/ml sampai dengan 8,1 ng/ml.

### 2 Istilah dan definisi

#### 2.1

##### **absorbansi**

penyerapan cahaya oleh partikel dalam suatu larutan dalam sistem optik pada ELISA *reader*

#### 2.2

##### **antibakterial**

suatu zat yang mampu membunuh, menghambat atau menekan kemampuan bakteri untuk bereproduksi

#### 2.3

##### **antibodi**

molekul *immunoglobulin* yang mempunyai suatu rantai asam amino spesifik, hanya berinteraksi dengan antigen yang menginduksi sintesis molekul ini di dalam sel dari seri limfoid (khususnya sel plasma), atau dengan antigen yang erat hubungannya dengan antigen tersebut

#### 2.4

##### **antigen**

zat yang menyebabkan pembentukan antibodi bila disuntikan ke dalam organisme yang bisa berupa toksin (bakteri nabati, hewani), enzim, protein hewani dan nabati lain, atau sel nabati dan hewani

#### 2.5

##### **contoh uji**

sejumlah daging ikan dan udang yang akan diuji

#### 2.6

##### ***dilution factor***

faktor pengenceran yang diperoleh dari penambahan volume larutan pengencer

#### 2.7

##### **ekstraksi**

proses pemisahan senyawa diantara dua fase zat yang tidak bercampur

#### 2.8

##### **enzim**

protein yang bertindak sebagai katalis biologis berfungsi mempercepat reaksi kimia di dalam jaringan organisme



## 2.9

### **enzyme linked immunoassay (ELISA)**

teknik biokimia yang digunakan untuk mendeteksi dan mengukur suatu antibodi maupun antigen pada contoh uji

## 2.10

### **inkubasi**

pengkondisian campuran reaksi, dan semacamnya dalam lingkungan temperatur yang sesuai dan konstan selama kurun waktu tertentu agar tercapai hasil/akibat tertentu

## 2.11

### **sulfonamide**

kristal putih yang umumnya sukar larut dalam air, tetapi garam natriumnya mudah larut dan digunakan untuk aditif makanan serta mengobati infeksi *usus*, dan lainnya (sistemik)

## 2.12

### **sumuran (well)**

lubang sumuran pada *microtiter plate* yang berisi antigen

## 3 Prinsip

Metode deteksi metabolite *sulfonamide* berdasarkan prinsip "*reaksi antigen – antibody*". Mikrotiter *well* telah dilapisi oleh antigen. Larutan standar atau contoh, *conjugate enzyme sulfonamide* dan antibodi anti-*sulfonamide* ditambahkan pada sumuran (*well*). *Sulfonamide* bebas dan *conjugate enzyme sulfonamide* akan berikatan pada sisi aktif *antigen*. Ikatan *conjugate* akan diubah oleh *chromogen* menjadi larutan berwarna biru. Kemudian ditambahkan *stop solution* yang akan mengubah warna biru menjadi warna kuning, yang diukur dengan *microtiter plate reader* pada panjang gelombang 450 nm. Nilai absorbansi yang didapat berbanding terbalik dengan konsentrasi *sulfonamide* di dalam contoh uji.

## 4 Peralatan

- a) blender laboratorium;
- b) evaporator (*nitrogen evaporator*);
- c) ELISA reader/ *microtiter plate reader* (450 nm/630 nm);
- d) *freezer* (maksimal - 20 °C);
- e) labu ukur 100 ml, 500 ml;
- f) *micropipettes*: 20 µl sampai dengan 200 µl, 100 µl sampai dengan 1 000 µl;
- g) *multi-channel pipette* 250 µl;
- h) *mini mixer/ shaker*;
- i) pipet volumetrik 10 ml;
- j) *rubber pipette bulb*;
- k) *repeater pipet*;
- l) sentrifus (minimal 6 000 rpm); tabung reaksi 10 ml;
- m) tabung sentrifus plastik 50 ml;
- n) timbangan analitik sensitivity 0,1 mg.

## 5 Bahan

### 5.1 Bahan ELISA kit

- a) *anti-sulfonamide antibody*;
- b) *buffer*;



- c) *conjugate*;
- d) *microtiter plate*;
- e) *red chromogen pro*;
- f) *standard solutions* (0 ng/ml; 0.1 ng/ml; 0.3 ng/ml; 0.9 ng/ml; 2.7 ng/ml; 8.1 ng/ml);
- g) *stop solution*;
- h) *washing buffer*.

## 5.2 Bahan pendukung

- a) akuabides;
- b) etil asetat ( $\text{CH}_3\text{COOC}_2\text{H}_5$ ) p.a/GR;
- c) kertas tisu;
- d) metanol ( $\text{CH}_3\text{OH}$ )p.a/GR;
- e) n- heksan ( $\text{C}_6\text{H}_{12}$ )p.a/GR;
- f) natrium chlorida ( $\text{NaCl}$ ) p.a/GR;

## 6 Prosedur kerja

### 6.1 Preparasi contoh uji

- a) Lumatkan contoh uji (minimal gram) dengan blender hingga homogen.
- b) Simpan contoh uji yang telah homogen pada wadah yang bersih dan tertutup.
- c) Jika contoh uji tidak langsung diuji maka simpan dalam *freezer* (- 20 °C) sampai analisa akan dilakukan.

### 6.2 Ekstraksi

- a) Timbang 1 gram homogenat contoh uji dalam tabung sentrifus dan tambahkan 2 ml metanol, aduk dengan *mini mixer/shaker* selama 30 detik, kemudian sentrifugasi pada kecepatan 6 000 rpm selama 10 menit.
- b) Pipet 1,5 ml supernatan dari butir a ke dalam tabung sentrifus baru.
- c) Tambahkan 0,5 ml *buffer* dan 1 ml n-heksan, aduk dengan *mini mixer/shaker* selama 10 detik, kemudian sentrifugasi pada 6000 rpm selama 10 menit.
- d) Ambil fase bawah (lapisan *buffer*) sebanyak 50 µl dan masukkan ke dalam sumuran (*well*).

**CATATAN** Bagan alir ekstraksi digambarkan pada Lampiran A

### 6.3 Proses pengujian ELISA

- a) Masukkan 50 µl masing-masing standar *sulfonamide* (0 ng/ml; 0.1 ng/ml; 0.3 ng/ml; 0.9 ng/ml; 2.7 ng/ml; 8.1 ng/ml) ke dalam sumuran (*well*) yang berbeda sumuran (*well*) dengan dua kali ulangan (*duplo*).
- b) Masukkan 50 µl masing - masing contoh uji ke dalam sumuran (*well*) yang berbeda (kerjakan dua ulangan).
- c) Tambahkan 50 µl *conjugate*.
- d) Tambahkan 50 µl anti - *sulfonamide antibody*, goyang pelan-pelan selama 10 detik.
- e) Inkubasikan *microtiter plate* dalam inkubator selama 1 jam pada suhu 20 °C sampai dengan 25 °C.
- f) Buang cairan dari dalam *microtiter plate* dan ketukkan *microtiter plate* dengan keras secara terbalik pada alas yang dilapisi kertas tisu.
- g) Bilas *microtiter plate* dengan 250 µl *washing bufffer* sebanyak dua kali.
- h) Tambahkan 100 µl *red chromogen pro*, goyang pelan - pelan selama 10 detik.
- i) Inkubasikan kembali dalam inkubator selama 15 menit pada suhu 20 °C sampai dengan 25 °C.



- j) Tambahkan 100 µl *stop solution* ke dalam tiap sumuran (*well*), dan homogenkan secara perlahan dengan cara menggoyangkan *microtiter plate* secara manual.
- k) Rangkaian sumuran (*well*) dibaca pada panjang gelombang 450 nm dengan alat *microtiter plate reader*.

**CATATAN 1** Bagan alir assay prosedur ELISA untuk analisis *sulfonamide* digambarkan pada Lampiran B.

**CATATAN 2** Posisi standar *sulfonamide* dan contoh uji pada *well* digambarkan seperti pada Lampiran C.1.

## 7 Perhitungan hasil

- Kurva kalibrasi standar *sulfonamide* dapat dibuat dari pembacaan % absorbansi setiap standar dengan konsentrasi standar dalam ng/ml pada kurva logaritma.

$$\frac{B}{B_0} \% = \frac{\text{Absorbansi standar}}{\text{Absorbansi standar } 0 \text{ ng/ml}} \times 100\%$$

- Masukkan hasil pembacaan % absorbansi contoh uji ke dalam kurva kalibrasi standar.

$$\frac{B}{B_0} \% = \frac{\text{Absorbansi contoh}}{\text{Absorbansi standar } 0 \text{ ng/ml}} \times 100\%$$

- Nilai konsentrasi *sulfonamide* pada contoh diperoleh dari persamaan logaritma standar dalam nilai ng/g setelah dikalikan *dilution factor* 1,0.

**CATATAN** Model kurva kalibrasi standar *sulfonamide* digambarkan seperti pada Lampiran C.2.

## 8 Interpretasi hasil

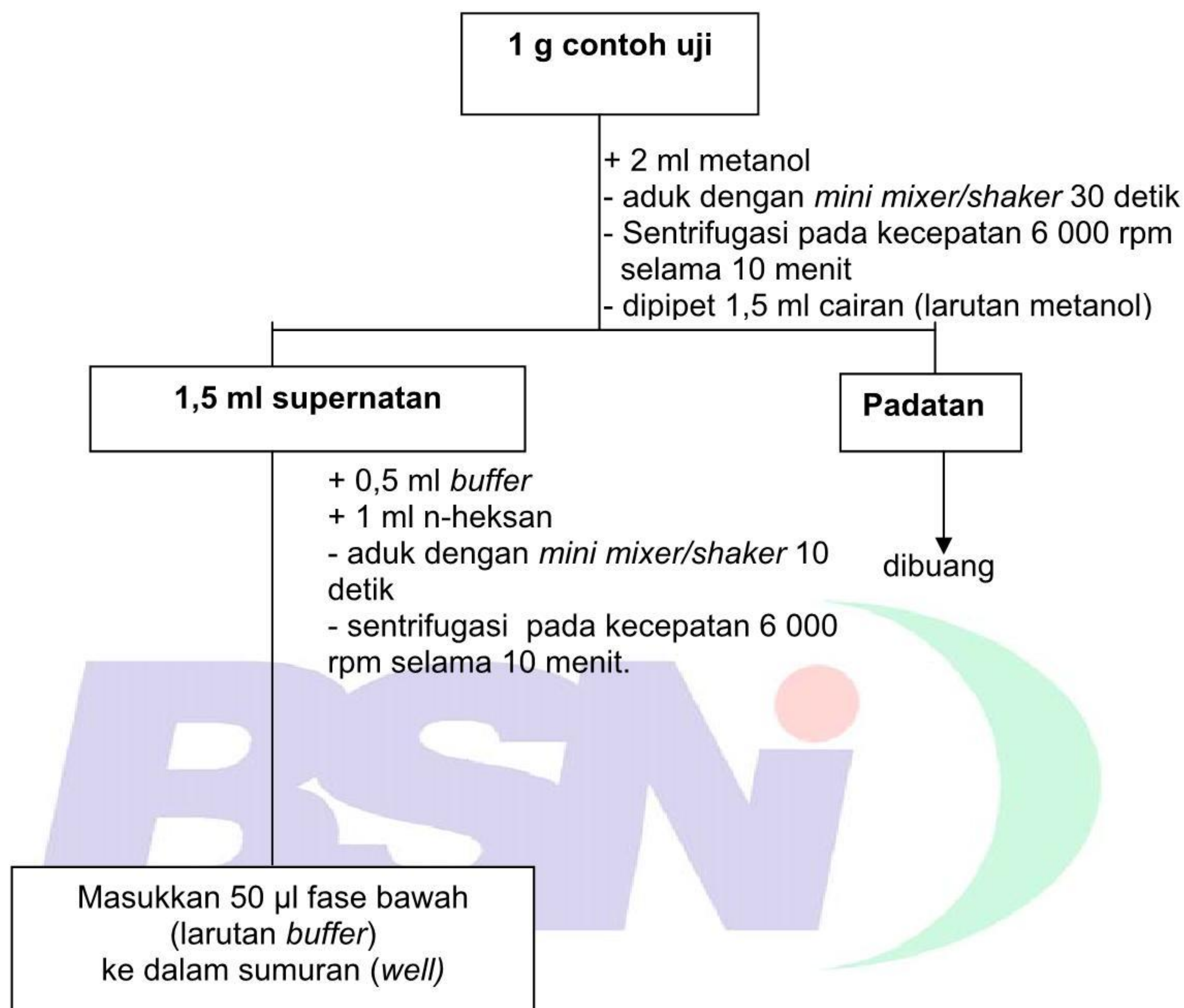
Berdasarkan hasil perhitungan *software ELISA reader* hasil dinyatakan positif, bila nilai melebihi *cut off* yang telah ditentukan sesuai contoh grafik.

## 9 Pengendalian mutu hasil uji

- a) Semua reagen harus pro analisis (p.a)/ *grade reagent* (GR)
- b) Keluarkan reagen kit dan biarkan pada suhu ruang (20 °C sampai dengan 25 °C) selama 15 menit sampai dengan 30 menit sebelum digunakan.
- c) Simpan kembali semua reagen kit pada suhu 2 °C sampai dengan 8 °C dengan segera setelah digunakan.
- d) Pertahankan sumuran (*well*) selama pengujian agar tidak kering
- e) Hindari sinar matahari langsung pada saat inkubasi. Sebaiknya tutupi *microtiter plate*.
- f) Semua reagen harus dicampur secara hati-hati hingga homogen.
- g) Siapkan reagen sesuai kebutuhan sumuran (*well*) yang digunakan.
- h) Jangan memasukkan kembali reagen yang telah disiapkan ke dalam botol stok.
- i) Gunakan barang-barang yang habis pakai untuk menghindari kontaminasi
- j) Simpan kit pada suhu 2 °C sampai dengan 8 °C atau di lemari pendingin hingga masa berlakunya habis.
- k) Kondisikan ELISA *reader*, dengan cara menghidupkan 15 menit sebelum digunakan.



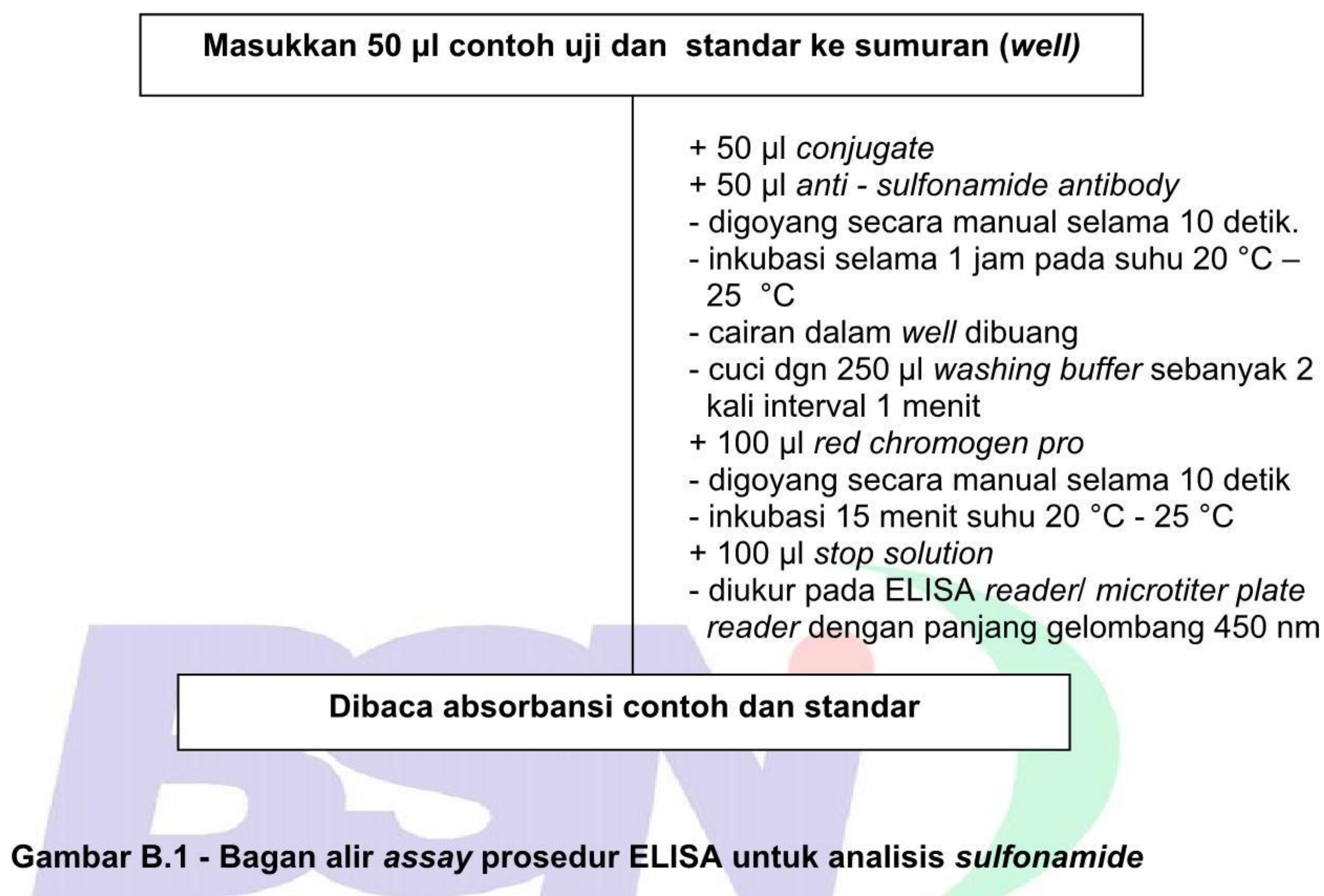
**Lampiran A**  
(informatif)  
**Bagan alir ekstraksi contoh uji untuk analisis *sulfonamide***



**Gambar A.1 - Bagan alir ekstraksi contoh uji untuk analisis *sulfonamide***



**Lampiran B**  
(informatif)  
**Bagan alir assay prosedur ELISA untuk analisis *sulfonamide***





## Lampiran C (normatif)

### Posisi standar *sulfonamide* dan contoh uji pada *well* dan model kurva kalibrasi standar *sulfonamide*

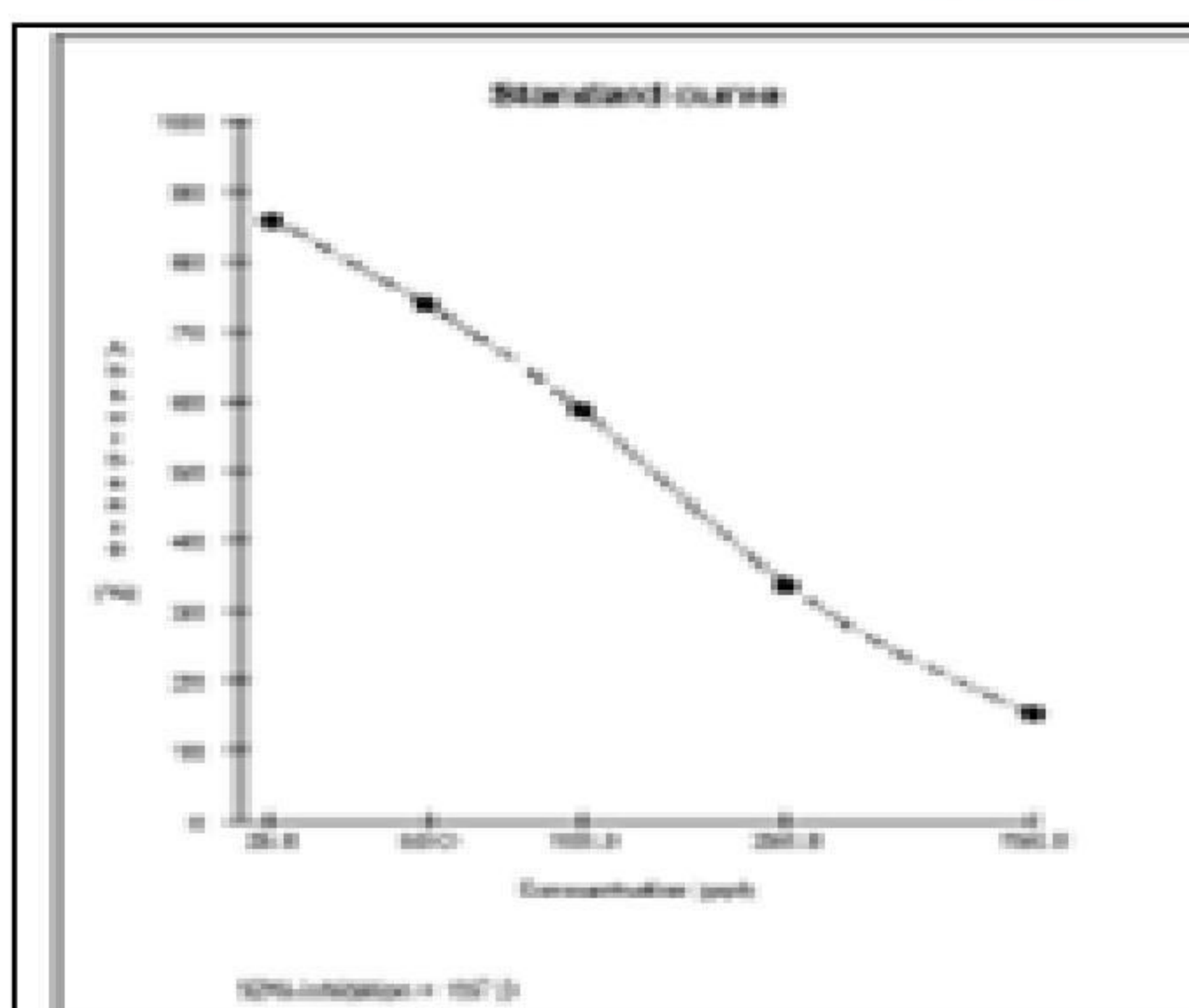
#### C.1 Posisi standar *sulfonamide* dan contoh uji pada *well*

**Tabel C.1 – Susunan standar *sulfonamide* dan contoh uji pada *well***

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	S-0	S-2.7	C-3	C-7	C-11	C-15	C-19	C-23	C-27	C-31	C-35	C-39
B	S-0	S-2.7	C-3	C-7	C-11	C-15	C-19	C-23	C-27	C-31	C-35	C-39
C	S-0.1	S-8.1	C-4	C-8	C-12	C-16	C-20	C-24	C-28	C-32	C-36	C-40
D	S-0.1	S-8.1	C-4	C-8	C-12	C-16	C-20	C-24	C-28	C-32	C-36	C-40
E	S-0.3	C-1	C-5	C-9	C-13	C-17	C-21	C-25	C-29	C-33	C-37	C-41
F	S-0.3	C-1	C-5	C-9	C-13	C-17	C-21	C-25	C-29	C-33	C-37	C-41
G	S-0.9	C-2	C-6	C-10	C-14	C-18	C-22	C-26	C-30	C-34	C-38	C-42
H	S-0.9	C-2	C-6	C-10	C-14	C-18	C-22	C-26	C-30	C-34	C-38	C-42

Keterangan :  
 S : kode larutan standar *sulfonamide* (0; 0.1; 0.3; 0.9; 2.7; 8.1) ng/ml;  
 C : kode larutan contoh uji (C1 – C42);  
 Lajur A-H : posisi *well* vertikal;  
 Lajur 1-12 : posisi *well* horisontal.

#### C.2 Model kurva kalibrasi standar *sulfonamide*



**Gambar C.1 - Kurva kalibrasi standar *sulfonamide***



## Bibliografi

Burgess, Graham, W. 1988. *Elisa Technology in Diagnosis and Research*. James Cook University of North Queensland.

Hadyana, Pudjaatmaka, A. 2002. *Kamus Kimia*. Balai Pustaka.

RIDASCREEN@Sulfonamide Kit Manual Catalog Art. No: R3004–R-Biopharm AG, Darmstadt, Germany.

